绣球‘杜丽’*AP*3 基因克隆与基因编辑载体构建

李童，王月莹，赵惠恩*

(花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室，林木花卉遗传育种教育部重点实验室，国家花卉工程技术研究中心，城乡生态环境北京实验室，北京林业大学园林学院，北京 100083)

摘　要：绣球 (*Hydrangea macrophylla*) 是以花序为主要观赏部位的园林植物，多用作切花装饰和景观营造，在亚洲、美洲、欧洲广泛栽培。为探究 *AP*3 基因在绣球花萼形成过程中的功能，加快重瓣绣球新品种培育进程，该研究以绣球‘杜丽’为材料，克隆其 MADS-box B 类基因 *HmAP*3，并结合生物信息学方法预测基因功能；根据 *HmAP*3 序列信息，筛选出高特异性编辑靶点并构建 CRISPR/Cas9 基因编辑载体，通过农杆菌转化法将载体整合到绣球基因组中。结果表明：(1) *HmAP*3 全长 546 bp，共编码 181 个氨基酸，测序结果表明其氨基酸序列与参考序列一致性为 100%，与拟南芥 AtAP3 相似度为 58.8%；(2)不同属植物 AP3 氨基酸序列差异较大，在同属不同物种中 AP3 蛋白主要结构则较为保守，仅在少数基序上存在差异；(3)在 *HmAP*3 中共鉴定到 2 个高特异性靶点，并成功构建 2 个单靶点 CRISPR/Cas9 基因编辑载体；(4)本研究共获得 5 株基因组内含有 *Cas*9 序列的抗性芽，但其靶点均未突变，在抗性芽中没有检测到 Cas9 表达。本研究探讨了 *AP*3 基因在重瓣绣球育种中的价值，对绣球的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术进行了初探，为绣球优良品种繁育工作奠定基础。

关键词：绣球，MADS-box 家族，*AP*3，CRISPR/Cas9，载体构建

中图分类号：Q943；S685.99　　　　　　**文献标识码**：A

*AP*3 gene cloning and gene-editing vector construction of *Hydrangea macrophylla* ‘Dooley’

LI Tong, WANG Yueying, ZHAO Huien*

(*Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University*, Beijing 100083, China)

Abstract: *Hydrangea macrophylla* is a garden plant widely cultivated in Asia, America, and Europe with its inflorescence as main ornamental feature. It is commonly used in interior decoration and landscape creation. To investigate the role of *AP*3 gene in hydrangea during calyx formation, *H. macrophylla* ‘Dooley’ was used as the material. The MADS-box class B gene *HmAP*3 was cloned, and its gene function was predicted by bioinformatics analysis. To explore quicker methods for breeding new varieties, highly-specific editing targets were screened and CRISPR/Cas9 gene-editing vectors were constructed. The vector sequence was integrated into the *H. macrophylla* genome by agrobacterium-mediated transformation. The results were as follows: (1) The full length of *HmAP*3 was 546 bp, encoding 181 amino acids. Its protein sequence was

---

基金项目：国家林业草原局引进国际先进林业科学技术项目(2015-4-15) [Supported by State Forestry and Grassland Administration Introduced International Advanced Forestry Science And Technology Projects (2015-4-15)]。

第一作者：李童(1997 -)，硕士，主要从事花卉物种质资源创新与育种研究，(E-mail) 13051865858@163.com。

***通信作者**：赵惠恩，博士，教授，研究方向为花卉种质资源创新与育种，(E-mail) zhaohuien@bjfu.edu.cn。

100% similar to the reference sequence and 58.8% similar to *Arabidopsis thaliana*. (2) AP3 differed greatly in different genera. Within the same genus, the main structure of AP3 was conserved and differed only in a few motifs. (3) There were 2 highly specific targets in *HmAP*3. Sequencing results indicated that both single-target CRISPR/Cas9 gene-editing vectors were constructed successfully. (4) There were 5 resistant buds with Cas9 sequences in their genomes. However, their target sequences did not change due to the absence of Cas9 expression. In this study, the potential of *AP*3 gene in the breeding work of double flower phenotype was investigated, and a preliminary exploration of CRISPR/Cas9 gene-editing technology for hydrangea was conducted. These results provide a basis for the breeding of *H. macrophylla*.
Key words: *Hydrangea macrophylla*, MADS-box family, *AP*3, CRISPR/Cas9, vector construction

绣球 (*Hydrangea macrophylla*)，虎耳草科绣球属，又名八仙花，在庭院景观中的应用历史悠久，是一种具有较高观赏价值的园林植物，又作为世界流行的切花深受大众喜爱。目前绣球主要有蕾丝帽型和圆球型两类花序，其花序中的不育花具有大而艳丽的花瓣状萼片，是绣球的主要观赏组织。绣球不育花有单瓣和重瓣之分，其中单瓣类只有一轮观赏性萼片，重瓣类则具有多轮观赏性萼片。相比之下，重瓣绣球具有更高的观赏和经济价值，是绣球新品种培育的重要方向 (Suyama et al., 2015)。目前国内外的绣球育种方式以杂交育种为主，其育种效率低、周期长，难以适应日益增长的市场需求 (Wu et al., 2021)，需要探索更快捷、高效的育种方式。

CRISPR/Cas9 技术是一种新兴的基因编辑技术，能够定向改变植物的观赏性状，如改造花型、花色，延长观赏周期等，在园林植物新品种繁育工作中具有极大的发展潜力和经济价值 (Kaur et al., 2021)。CRISPR/Cas9 基因编辑系统由 Cas9 核酸酶和单引导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 构成 (Jinek et al., 2012)；二者在植物细胞内转录后形成复合体，识别植物基因组中的间区序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 前端约 20 nt 核苷酸序列并结合，Cas9 核酸酶切割该序列形成 DNA 双链缺口(DNA double-strand breaks, DSBs)，引发植物自身损伤修复机制，产生随机的碱基缺失 (Hsu et al., 2013)。与其他园艺作物相比，CRISPR/Cas9 技术在园林植物中的应用较少，仅在毛白杨 (Fan et al., 2015)、矮牵牛 (Zhang et al., 2016; Sun & Kao, 2018; Xu et al., 2020; Yu et al., 2021)、菊花 (Kishi-Kaboshi et al., 2017)、铁皮石斛 (Kui et al., 2017)、百合 (Yan et al., 2019)、牵牛花 (Shibuya et al., 2018; Watanabe et al., 2018)、蓝猪耳 (Nishihara et al., 2018)与蝴蝶兰 (Tong et al., 2020; Semiarti et al., 2020) 中被应用。

花器官由花瓣、花萼、雄蕊和心皮 4 个部分组成，其基因表达调控机制可以用 ABCDE 模型来解释。在 ABCDE 模型中，B 类基因主要负责与 A 类基因共同调控花瓣的形成，及与 C 类基因共同调控雄蕊的形成 (Coen & Meyerowitz, 1991)；除 A 类基因中的 *AP*2 属 AP2/ERF 家族外，该模型中的其余基因均属于 *MADS-box* 基因家族 (王莹等, 2021)。MADS-box B 类基因亚家族成员广泛存在于现存植物的基因组中，在裸子植物小孢子叶球与被子植物花瓣和雄蕊中均有表达，在植物发育过程中具有重要地位 (Albert et al., 1998)。B 类基因包含 *APETALA*3 (*AP*3) 和 *PITILLATA* (*PI*) 两个谱系，其中 *AP*3 谱系主要调控花瓣和花萼的形成 (Jaramillo & Kramer, 2004)。AP3 蛋白中含有保守的 K-box 结构域，该结构域能够引导 AP3 蛋白与 PI、SEP3、AP1 蛋白形成四聚体，诱导花瓣原基形成 (Melzer & Theißen, 2009; Theißen et al., 2016)。在观赏植物中，已经发现 *AP*3 基因沉默能够导致矮牵牛 (van der Krol, 1993)、兰花 (Mondragón-Palomino & Theißen, 2009)与耧斗菜 (Zhang et al., 2013)等发生从花瓣向花萼的同源异型转变。

因此，本研究对绣球‘杜丽’的 MADS-box B 类基因 *HmAP*3 进行了克隆和生物信息学分析；同时结合组内前期绣球‘杜丽’再生体系建立基础，借助 CRISPR/Cas9 基因编辑系统，构建了 2 个 *HmAP*3 单靶点载体，转化获得抗性芽。拟探讨以下问题：(1) HmAP3 氨基酸序列保守结构域特征与蛋白结构分析；(2) HmAP3 系统进化关系及其生物学功能预测；(3) 探究影响绣球 CRISPR/Cas9 基因编辑工作成功率的因素。以期为绣球的性状改良和新品种繁育工作提供实践参考和技术支撑。

1　材料与方法

1.1　试验材料和试剂

绣球‘杜丽’种植于北京植物园 (116 °28′ E、40 °N)。于 4 月选取翠绿、无病虫害的叶片作为试验材料，将叶片与叶柄一并剪下，放入干净的蒸馏水中转移至实验室。

试验所用的试剂盒包括：植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司，DP350) ，植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司，DP432)，cDNA 反转录试剂盒 (TaKaRa，RR047A)，DNA 凝胶回收试剂盒 (北京擎科生物科技公司，GE0101)，One step ZTOPO-Blunt/TA 零背景快速克隆试剂盒 (北京庄盟生物科技有限公司，ZC206)，SE 无缝克隆和组装试剂盒 (北京庄盟生物科技有限公司，ZC231)，限制性内切酶 BsaI (纽英伦生物技术有限公司)。

1.2　绣球‘杜丽’*HmAP*3 基因克隆

依据在 NCBI 上查找到的绣球‘Blue Sky’ (*H. macrophylla*) *AP*3 基因 (GenBank: AF230702.1) 的 CDS 序列进行引物设计 (表 1) 并合成高特异性引物。

按照试剂盒说明书提取试验材料总 DNA 和 RNA，并将 RNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 和 DNA 为模板，用 KOD One 高保真 DNA 聚合酶 (TOYOBO，KMM-101)，以 HmAP3-F1/R1 为引物 (表 1) 进行 PCR 扩增。扩增产物利用琼脂糖凝胶电泳进行纯化，将目的片段所处区域凝胶切割下来，按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收。纯化后的 PCR 产物连接 T 载体后转入 DH5α 大肠杆菌感受态涂布平板培养 12 h，选取单菌落送至测序公司 (北京擎科) 进行质粒提取和测序工作，获得 *HmAP*3 基因的 CDS 序列和 DNA 序列。

1.3　绣球‘杜丽’HmAP3 基因生物信息学分析

使用 Cell-PLoc (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/) 对 *HmAP*3 进行亚细胞定位预测 (Chou & Shen, 2010)。利用 NCBI-BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 比对 HmAP3 氨基酸序列相似性，下载比对结果中排名在前列的其他植物 AP3 氨基酸序列，同时下载拟南芥 AtAP3 氨基酸序列，使用 MEGA-X 用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树 (Zhang et al., 2019)。利用 MEME (http://meme-suite.org/tools/meme/) 预测 HmAP3 氨基酸序列保守基序。通过 ProrParam (https://web.expasy.org/protparam/) 分析 HmAP3 蛋白的理化性质 (Li et al., 2020)。分别使用蛋白二级结构预测工具 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html/) 和蛋白三级结构预测工具 Swiss model (https://swissmodel.expasy.org/) 对 HmAP3 氨基酸序列进行分析。

1.4　CRISPR/Cas9 基因编辑载体构建和转化

使用 CRISPR 靶点设计网站 CRISPRdirect (http://crispr.dbcls.jp/) 根据 *HmAP*3 基因的 CDS 序列，选择 PAM 位点和 GC 含量在 40%～60% 之间的高特异性靶点。以 pCAMBIA1300-sgRNA/Cas9 载体质粒为模板，HmAP3-F2/R2、HmAP3-F3/R3 为引物 (表 1)，进行 PCR 扩增获得带有黏性末端的目的片段。使用内切酶 BsaI 酶切获得 pCAMBIA1300-sgRNA/Cas9 线性载体，用无缝克隆试剂盒 (北京庄盟生物科技有限公司，ZC231) 连接载体和目的片段，获得重组质粒。构建好的质粒转入 DH5α 大肠杆菌感受态涂布平板培养 12 h，选取单菌落送至测序公司 (北京擎科) 进行质粒提取和测序工作，回收构

建成功的载体质粒。将构建好的载体 pCAMBIA1300::HmAP3 利用冻融法转入 GV3101 农杆菌感受态中，在 2 抗 LB 培养基（50 mg·L^{-1} 卡那霉素 + 50 mg·L^{-1} 利福平）中 28 ℃ 培养 2 d，挑取单菌落在 LB 液体培养基扩繁。离心收集扩繁的农杆菌菌体，加入适量侵染液（MS + 30 g·L^{-1} 蔗糖 + 200 μmol·L^{-1} 乙酰丁香酮）调至 OD_{600} = 0.4。

将绣球‘杜丽’叶片剪切成 1cm × 1cm 的小块，在叶背划 3～4 刀，放入上述配制好的侵染液中浸泡侵染 10 min，转接到共培养培养基（MS + 2.0 mg·L^{-1} 6-BA + 0.1 mg·L^{-1} IBA）上暗培养 2 d，再转移到筛选培养基（MS + 2.0 mg·L^{-1} 6-BA + 0.1 mg·L^{-1} IBA + 2 mg·L^{-1} 潮霉素 + 200 mg·L^{-1} 头孢霉素）中至获得抗性再生芽。

1.5 抗性芽检测和鉴定

取抗性芽叶片，使用基因组提取试剂盒获取叶片 DNA，再依次使用总 RNA 提取试剂盒、cDNA 反转录试剂盒获取叶片 cDNA。分别以叶片 DNA 和 cDNA 为模板，Cas9-F/R 为引物扩增 *Cas*9 序列，扩增片段长度为 764 bp。以叶片 DNA 为模板，HmAP3-F1/R1 为引物扩增抗性芽 *HmAP*3 序列，扩增产物送至测序公司（北京擎科）测序。使用 DNAMAN 比对测序结果与野生型序列差异。

表 1 本研究中所使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

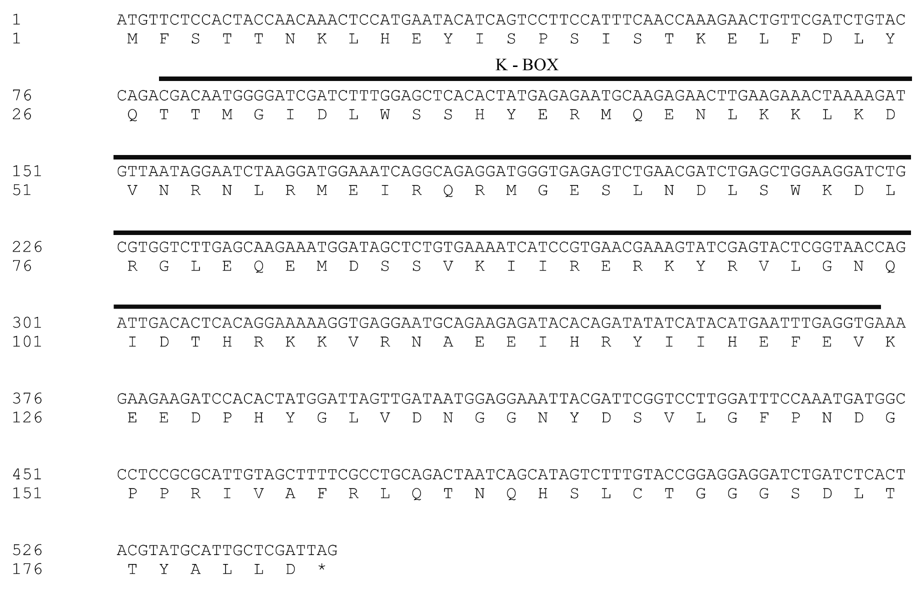
引物名称 Primer name	序列 Sequence (5′→3′)	退火温度 Annealing temperature（℃）	用途 Purpose
HmAP3-F1 HmAP3-R1	5′- ATGTTCTCCACTACCAACAAACT -3′ 5′- CTAATCGAGCAATGCATACGTAG -3′	56	*HmAP*3 全长扩增 *HmAP*3 full-length amplification
HmAP3-F2 HmAP3-R2	5′- ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTG GATCTGTACCAGACGACAATGTTTTAGAGCT AGAAATAGC -3′ 5′- TTCTGCAGACAAATGGCCCCCATTCG GAGTTTTTGTATCT -3′	58	CRISPR/Cas9 载体构建-靶点 1 CRISPR/Cas9 vector construction- Target 1
HmAP3-F3 HmAP3-R3	5′- ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTG GTACTCGATACTTTCGTTCAGTTTTAGAGCTA GAAATAGC -3′ 5′- TTCTGCAGACAAATGGCCCCCATTCG GAGTTTTTGTATCT -3′	58	CRISPR/Cas9 载体构建-靶点 2 CRISPR/Cas9 vector construction- Target 2
Cas9-F Cas9-R	5′- CAAGTTCATCAAGCCCATCC -3′ 5′- GTCCTCGTTTTCCTCATTGTC -3′	52	抗性芽 *Cas*9 序列检测 *Cas*9 sequence detection in resistant buds

2 结果与分析

2.1 绣球‘杜丽’*AP*3 基因克隆与序列分析

参考绣球‘Blue Sky’ *AP*3 基因 CDS 序列，利用 HmAP3-F1/ HmAP3-R1 引物（表 1），在绣球‘杜丽’cDNA 文库和基因组中克隆到了两段完全一致的核苷酸序列，说明该基因结构中无内含子。克隆到的基因全长 546 bp，共编码 181 个氨基酸，利用 NCBI 分析其氨基酸序列，发现在 30～123 bp 处包含 1 个 K-BOX 保守结构域（图 1）。该氨基酸序列 C 端含有 PI 基序和 euAP3 基序，符合 MADS-box 家族特征，命名为 *HmAP*3。将 HmAP3 与拟南芥 AtAP3 氨基酸序列比对，其相似度为 58.8%；*HmAP*3 与绣球‘Blue Sky’ *AP*3 的 DNA 序列相似度为

100%。因此，推测该基因为绣球‘杜丽’*AP*3 基因。亚细胞定位预测结果显示 *HmAP*3 在细胞核中表达。



* 表示终止子。

* indicates terminator.

图 1 *HmAP*3 序列及其结构域分析

Fig.1 Sequence and structural domain analysis of *HmAP*3

2.2 绣球‘杜丽’AP3 蛋白系统进化与 motif 分析

将 HmAP3 氨基酸序列提交到 NCBI 进行 BLAST 比对，在比对结果中选取下载与该序列相似度较高的其他植物 AP3 氨基酸序列，在 MEGA-X 软件上用邻接法构建系统进化树 (图 2)。从整体上来看，绣球等蔷薇亚纲菊超目植物被聚为同一大支，说明 AP3 蛋白在系统进化过程中具有一定保守性。从各小分支来看，不同物种间的 AP3 序列存在一定差异，而同物种间的序列相似度则较高。相对而言，绣球与神秘果 (*Synsepalum dulcificum*)、洒金桃叶珊瑚 (*Aucuba japonica* var. *borealis*) 和欧洲枸骨 (*Ilex aquifolium*) 亲缘关系最近。在模式植物中，绣球与烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的亲缘关系比拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 更近。因此，使用烟草基因组作为预测绣球基因编辑靶点的参考基因组更为适宜。

在 MEME-motif suite 工具上对上述氨基酸序列进行分析后，获得了 15 个 motif 及其在序列中的相对位置 (图 2)。大部分植物 AP3 序列包含 7 个 motif，其中有 8 个 AP3 序列包含 8 个 motif，1 个 AP3 序列包含 9 个 motif。所有 AP3 序列 C 端较为保守，均含有 motif 2、motif 4、motif 5、motif 6 和 motif 7，而 N 端多含 motif 3。与其他植物相比，绣球 AP3 序列中含有特有的 motif 12，此外仅洒金桃叶珊瑚 AP3 序列中含有这一基序，说明 HmAP3 相对其他植物 AP3 蛋白可能会有更多功能。对同源基因来说，其序列的 motif 大体相似，然而在不同物种间仍存在一定的差异，这些差异导致了不同物种间同源基因的功能差异。

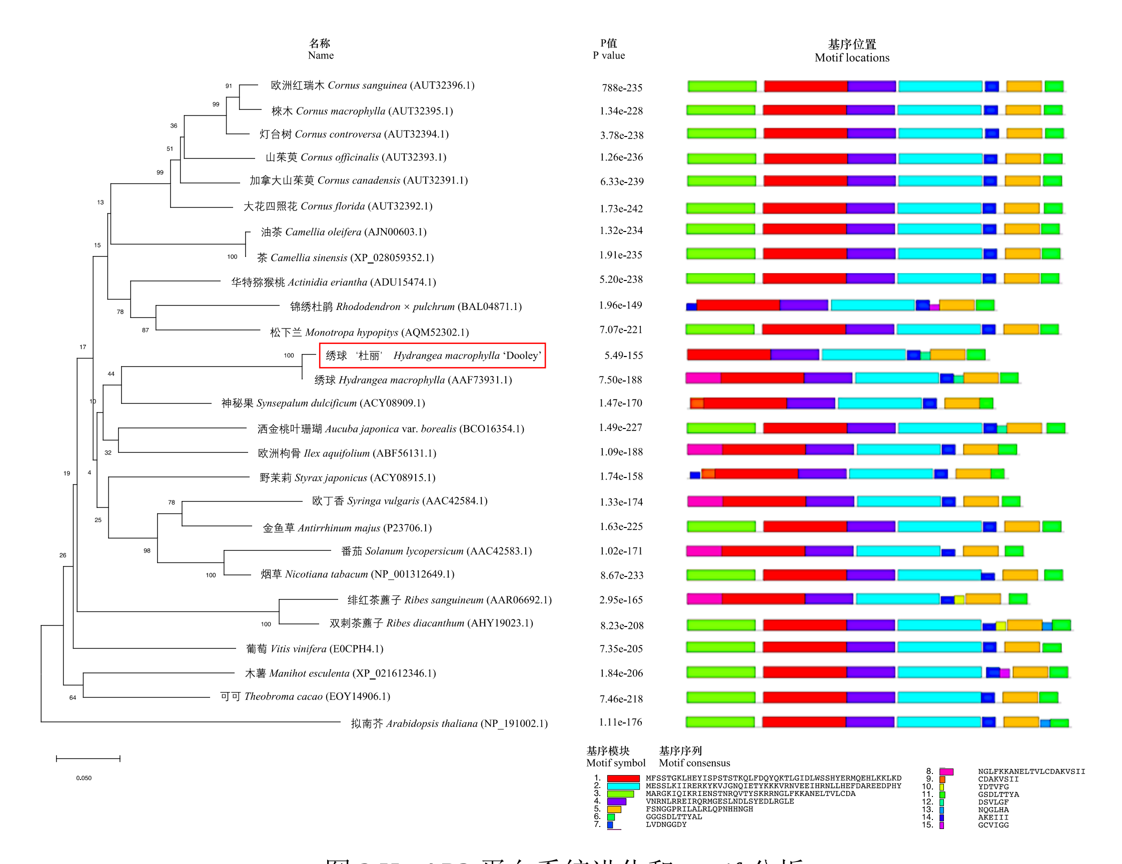
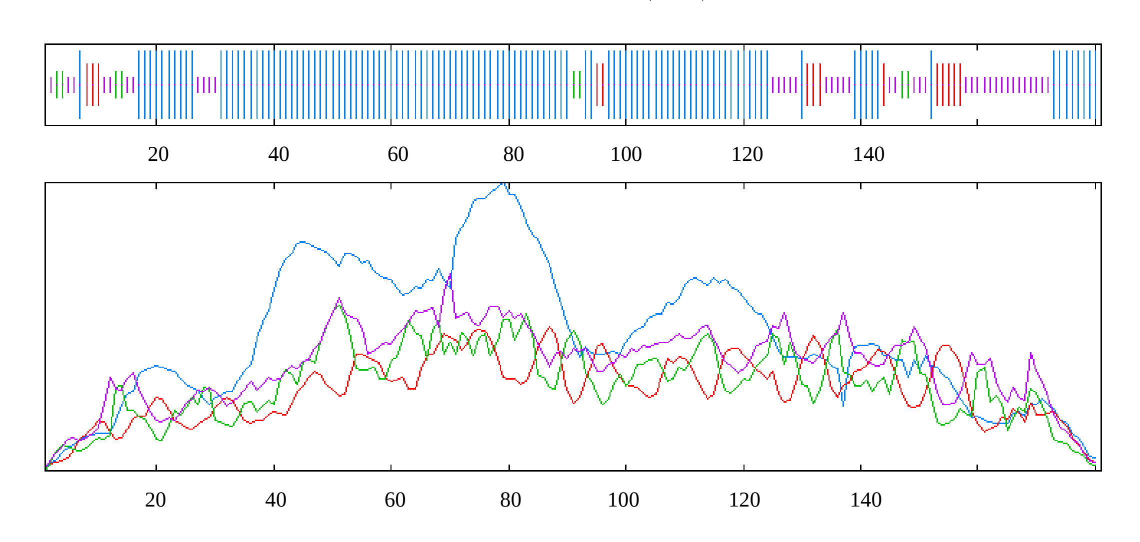


图 2 HmAP3 蛋白系统进化和 motif 分析

Fig.2 Phylogenetic and motif analysis of HmAP3

2.3 绣球‘杜丽’AP3 蛋白理化性质与结构分析

绣球‘杜丽’的 HmAP3 蛋白分子式为 $C_{927}H_{1462}N_{268}O_{287}S_7$，分子量为 21 177.85 kD。该蛋白共包含 181 个氨基酸，不稳定系数为 38.79，属稳定蛋白。蛋白带负电荷残基总数（Asp + Glu) 28，带正电荷残基总数(Arg + Lys) 25，理论等电点 6.17。蛋白脂肪指数 79.12，亲水性（GRA-VY) – 0.791，为亲水性蛋白。HmAP3 蛋白二级结构中 α-螺旋占比最高，为 64.09%；其与结构占比由高到低依次为无规则卷曲（22.65%)、延伸链(8.84%)、β-折叠(4.42%) (图 3)。以拟南芥 MADS-box 类蛋白三级结构为模型，预测 HmAP3 蛋白三级结构，可见该结构中含有 2 条长 α-螺旋，螺旋间纽结为 90 °；其预测结果 GMQE（全球模型质量估计）值为 0.32，QMEAN 得分 0.74 ±0.05，模型可信度和质量较高（图 4)。



蓝色表示 α-螺旋，紫色表示无规则卷曲，绿色表示 β-折叠，红色表示延伸链。

Blue indicates α-helix, purple indicates random coil, green indicates β-angel, and red indicates extended strand.

图 3 HmAP3 蛋白二级结构

Fig.3 Secondary structure of HmAP3 protein

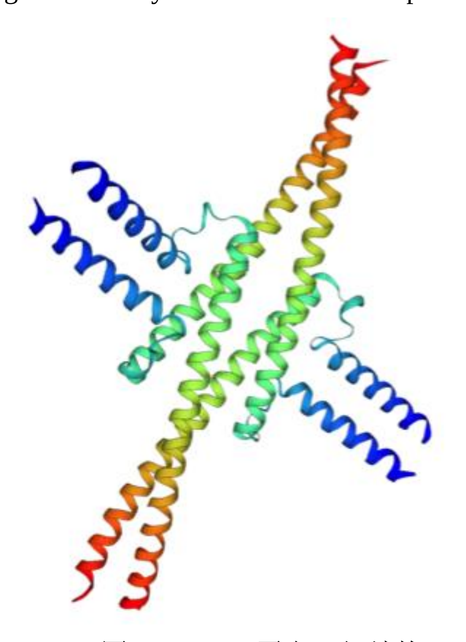
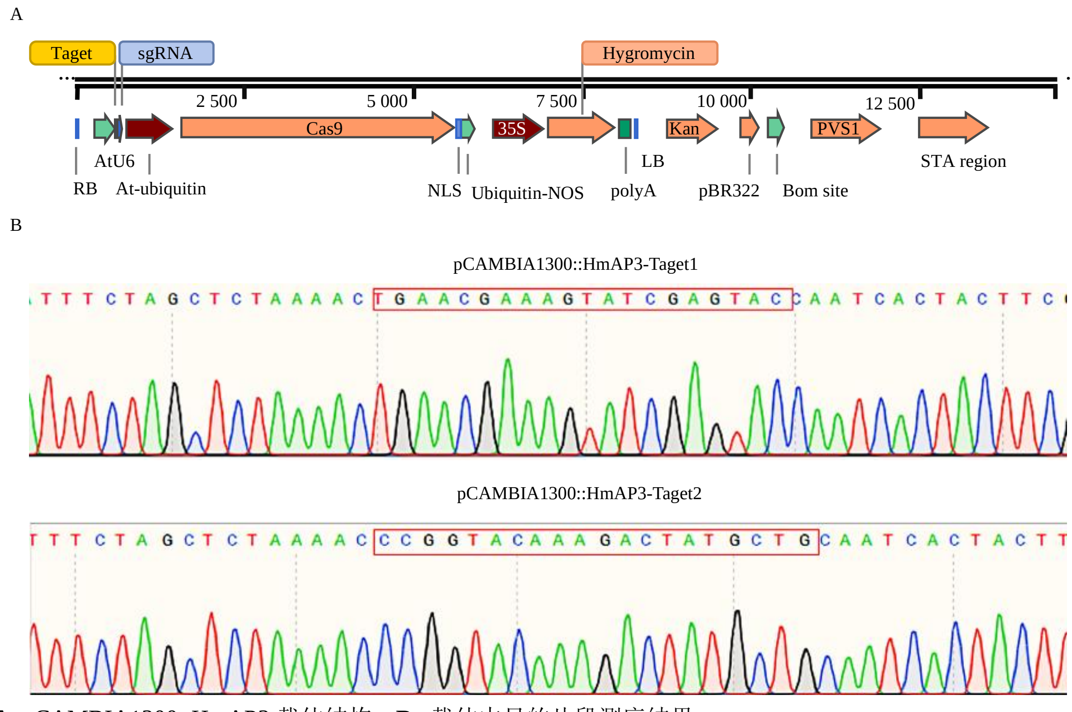


图 4 HmAP3 蛋白三级结构

Fig.4 Tertiary structure of HmAP3 protein

2.4 CRISPR/Cas9 基因编辑载体构建

利用 CRISPRdirect 在 *HmAP*3 上共选取到 2 个特异性强的靶点，分别命名为 HmAP3-Taget1 (5′- GATCTGTACCAGACGACAAT + GGG -3′) 和 HmAP3-Taget2 (5′-TGAACGAAAGTATCGAGTAC + CGG -3′)，其 GC 含量分别为 45 %和 40 %，其与 PAM 位点相邻的 12 bp 在参考基因组 (烟草) 中均仅比对到 1 个位点，证明该靶点具有较强特异性。用引物 HmAP3-F2/R2、HmAP3-F3/R3 在质粒上扩增含有粘性末端的目的片段，与线性载体连接，用大肠杆菌转化后挑取单菌落测序，测序结果表明目的片段已成功插入载体，插入片段与载体结构如图所示 (图 5)。绣球对潮霉素敏感性很高，经 2 mg·L^{-1} 潮霉素筛选后，在侵染约 2 000 枚叶片后仅培育出 9 株抗性芽。以抗性芽叶片 DNA 为模板，分别使用靶基因序列扩增引物 HmAP3-F1/ HmAP3-R1 和 *Cas*9 序列扩增引物 Cas9-F/Cas9-R 对抗性芽进行鉴定。扩增和测序结果表明，9 株抗性芽叶片基因组中有 5 株可克隆到 *Cas*9 序列，但其靶点序列均未发生突变 (图 6：B)。提取抗性芽叶片总 RNA 后反转录获得 cDNA，再次克隆 *Cas*9 序列，发现所有样品均无法扩增出条带。该现象说明载体序列虽已成功整合到载体基因组上，但 Cas9 蛋白并未成功转录和表达，因此，编辑靶点的序列没有改变。

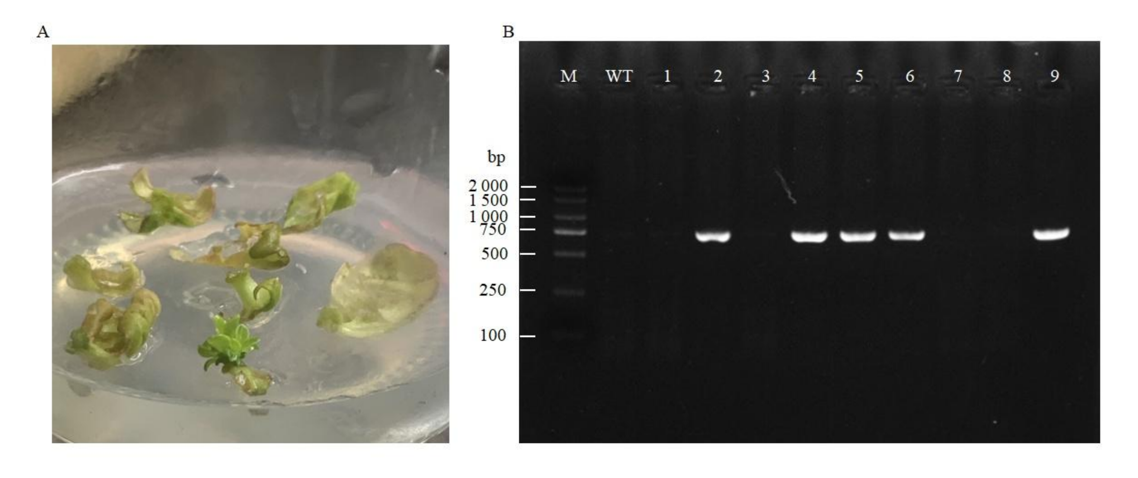


A. pCAMBIA1300::HmAP3 载体结构；**B**. 载体中目的片段测序结果。

A. Structure of pCAMBIA1300::HmAP3 vector; **B**. Sequencing results of the target fragment in the vector.

图 5 pCAMBIA1300::HmAP3 载体图谱及目的片段插入情况

Fig.5 pCAMBIA1300::HmAP3 vector mapping and target fragment insertion



A. 绣球‘杜丽’抗性芽的生长状况；**B**. 抗性芽基因组中 *Cas*9 序列扩增（**M**. DL2000 DNA Marker；**WT**. 野生型；**1 – 9**. 绣球‘杜丽’抗性芽）。

A. Resistant buds growth of *Hydrangea macrophylla* ‘Dooley’; **B**. *Cas*9 amplification in the genome of resistant buds (**M**. DL2000 DNA Marker; **WT**. Wild type; **1–9**. Resistant buds of *Hydrangea macrophylla* ‘Dooley’).

图 6 绣球‘杜丽’抗性芽检测

Fig.6 Detection of resistant shoots of resistant buds of *Hydrangea macrophylla* ‘Dooley’

3 讨论与结论

本研究克隆了绣球‘杜丽’的 *HmAP*3 基因，并对其核苷酸序列与氨基酸序列进行了生物信息学分析。研究发现 HmAP3 与模式植物拟南芥 (Yang et al., 2003) 及园艺作物绿竹 (朱龙飞，2013)、葡萄 (胡晓燕等，2021)、菠萝 (郑雪文等，2021) 在特有的 K-box 结构域上

长度相近、结构相似，表明此结构域在不同物种的 AP3 中高度保守。理化性质分析结果表明 HmAP3 是稳定的亲水性蛋白，与郑雪文等 (2021) 研究一致。在 HmAP3 蛋白三级结构模型中，K-box 形成长 α-螺旋结构，与植物 MADS-box 家族中 K-box 结构域特征一致，该结构在 AP3 与其他蛋白结合形成四聚体的过程中发挥关键作用 (Yang & Jack, 2004)。

HmAP3 蛋白系统进化树表明 *AP*3 基因在植物系统进化过程中的保守性，其中绣球与金鱼草、烟草和番茄 *AP*3 基因聚类在同一大分支、亲缘关系较近，与 Viaene 等 (2009) 研究结果相似。Martino 等 (2006) 和 Liu 等 (2004) 研究发现，番茄 *SlAP*3 与烟草 *NtAP*3 基因沉默后代表现出花萼轮数增多、花瓣消失的性状。通过同源比对，推测绣球‘杜丽’*HmAP3* 基因与其同源基因 *SlAP*3、*NtAP*3 功能相似，可能负责调控绣球花器官中花萼和花瓣的形成。

本研究构建了 2 个绣球 *HmAP*3 单靶点载体，并在转化获得的抗性芽基因组中检测到载体序列，但在抗性芽中未检测到 *Cas*9 的表达和编辑位点序列突变。本研究与 Ren 等 (2013) 的研究结果相似，他推测基因编辑效率与启动子活性有关：因为当 CRISPR/Cas9 基因编辑载体中的启动子从 nos-mini 变为 U6b 启动子时，遗传突变率可从 0 提高至 3.2%。在观赏植物中，Kishi-Kaboshi 等 (2019) 的研究也佐证了这一观点，在系统性比较 Ubiqutin、CaMV 35S 和 CmActin2 启动子的表达活性差异后，发现 CaMV 35S 和 Ubiqutin 启动子在菊花愈伤组织中活性均低于菊花 CmActin2 启动子。本研究使用的 *Cas*9 序列启动子为 Ubiqutin 启动子，猜想其在绣球组织中的表达活性极低，导致 *Cas*9 序列在抗性芽中未表达。在下一步绣球基因编辑工作中，可将载体中启动子更换为绣球本源启动子，进一步探究启动子活性对基因编辑成功率的影响。

本研究发现绣球对潮霉素的高敏感性也是影响 CRISPR/Cas9 基因编辑效率的重要因素。本研究使用 2 mg·L^{-1} 潮霉素浓度对绣球抗性芽进行筛选，再生率仅为 0.45%，与苹果 (贾东杰等，2013) 等在潮霉素筛选下的再生情况相符，推测绣球野生型基因组内不含有潮霉素抗性基因。甘煌灿等 (2018) 提出可通过在再生筛选过程中逐渐增加潮霉素浓度的方法，提高抗性芽的成活率。后续的绣球抗性芽的筛选条件可通过调整不同再生阶段潮霉素浓度的方式进一步优化，以提高基因编辑效率。

本研究在绣球‘杜丽’中克隆到 1 个 *HmAP*3 基因，长 546 bp，氨基酸序列长 181 bp，为稳定的亲水性蛋白，氨基酸序列结构分析证明其具有 MADS-box B 类基因亚家族特征，系统进化分析表明 *HmAP*3 与烟草、番茄、金鱼草亲缘关系较近，基序组成结构保守。研究以 *HmAP*3 为靶点，成功构建 2 个以 *Cas*9 基因、sgRNA、潮霉素抗性基因为骨架的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体，并将载体序列整合到绣球基因组中。上述研究结果对进一步研究 *HmAP*3 基因功能奠定理论基础，为重瓣绣球基因编辑辅助育种工作提供技术支撑。

参考文献：

ALBERT VA, GUSTAFSSON MHG, LAURENZIO LD, 1998. Ontogenetic systematics, molecular developmental genetics, and the angiosperm petal[M]//Molecular Systematics of plants II. Boston: Springer: 349-374.

CHOU KC, SHEN HB, 2010. Cell-PLoc 2.0: an improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms[J]. Nat Sci, 2(10): 1090.

COEN ES, MEYEROWITZ EM, 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development[J]. Nature, 353(6339): 31-37.

FAN D, LIU TT, LI CF, et al., 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation[J]. Sci Rep, 5(1): 1-7.

GAN HC, LAI CC, PAN H, et al., 2018. Plant expression vector construction and jasmine (*Jasminum sambac* (Linn.) Aiton) callus transformation of *DFR* gene from spine grape (*Vitis davidii* Foëx.) [J]. Chin J Trop Crop, 39(6): 1128-1136. [甘煌灿，赖呈纯，潘红，等，2018.

刺葡萄 *DFR* 基因植物表达载体构建及转化茉莉花愈伤组织的研究[J]. 热带作物学报，39(6)：1128-1136.]

HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, et al., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. Nat Biotechnol, 31(9): 827-832.

HU XY, GUO CL, WANG L, et al., 2021. Cloning and function analysis of *VvMADS*46 in red globe and thompson seedless for seedless regulation[J]. J Fruit Sci, 38(8): 1231-1239. [胡晓燕，郭春磊，王莉，等，2021. 无核白及红地球葡萄 *VvMADS*46 基因的克隆及其无核调控功能分析[J]. 果树学报，38(8)：1231-1239.]

JARAMILLO MA, KRAMER EM, 2004. *APETALA*3 and *PISTILLATA* homologs exhibit novel expression patterns in the unique perianth of *Aristolochia* (Aristolochiaceae)[J]. Evol Dev, 6(6): 449-458.

JIA DJ, FAN LM, SHEN JL, et al., 2013. Genetic transformation and expressing of astaxanthin biosynthesis genes *BKT* into 'Brookfield Gala' apple tree[J]. Acta Hort Sin, 40(1): 21-31. [贾东杰，樊连梅，沈俊岭，等，2013. 虾青素合成关键酶基因 *BKT* 在'Brookfield Gala'苹果中的遗传转化及表达[J]. 园艺学报，40(1)：21-31.]

JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al., 2012. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 337(6096): 816-821.

KAUR H, PANDEY DK, GOUTAM U et al., 2021. CRISPR/Cas9-mediated genome editing is revolutionizing the improvement of horticultural crops: recent advances and future prospects[J]. Sci Hort-Amsterdam, 289 (110476): 1-13.

KISHI-KABOSHI M, AIDA R, SASAKI K, 2017. Generation of gene-edited *Chrysanthemum morifolium* using multicopy transgenes as targets and markers[J]. Plant Cell Physiol, 58(2): 216-226.

KISHI-KABOSHI M, AIDA R, SASAKI K, 2019. Parsley ubiquitin promoter displays higher activity than the CaMV 35S promoter and the chrysanthemum Actin 2 promoter for productive, constitutive, and durable expression of a transgene in *Chrysanthemum morifolium*[J]. Breed Sci, 69(3): 19036.

KUI L, CHEN HT, ZHANG WX, et al., 2017. Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium officinale*[J]. Front plant sci, 7(2036): 1-13.

LIU YL, NAKAYAMA N, SCHIFF M, et al., 2004. Virus induced gene silencing of a deficiens ortholog in *Nicotiana benthamiana*[J]. Plant Mol Biol, 54(5): 701-711.

MARTINO GD, PAN I, EMMANUEL E, et al., 2006. Functional analyses of two tomato *APETALA*3 genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development[J]. Plant Cell, 18(8): 1833-1845.

MELZER R, THEIßEN G, 2009. Reconstitution of 'floral quartets' in vitro involving class B and class E floral homeotic proteins[J]. Nucl Acids Res, 37(8): 2723-2736.

MONDRAGÓN-PALOMINO M, THEIßEN G, 2009. Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of *class B* floral homeotic genes[J]. Ann Bot, 104(3): 583-594.

NISHIHARA M, HIGUCHI A, WATANABE A, et al., 2018. Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in *Torenia fournieri*[J]. Bmc Plant Biol, 18(1): 1-9.

REN XJ, SUN J, HOUSDEN BE, et al., 2013. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9[J]. Proc Natl Acad Sci, 110(47): 19012-19017.

SEMIARTI E, NOPITASARI S, SETIAWATI Y, et al., 2020. Application of CRISPR/Cas9 genome editing system for molecular breeding of orchids[J]. Indones J Biotechnol, 25(1): 61-68.

SHIBUYA K, WATANABE K, ONO M, 2018. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *EPHEMERAL*1 locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory[J]. Plant Physiol Biochem, 131(36): 53-57.

SUN LH, KAO TH, 2018. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *PiSSK*1 reveals essential role of S-locus F-box protein-containing SCF complexes in recognition of non-self S-RNases during cross-compatible pollination in self-incompatible *Petunia inflata*[J]. Plant Reprod, 31(2): 129-143.

SUYAMA T, TANIGAWA T, YAMADA A, et al., 2015. Inheritance of the double-flowered trait in decorative hydrangea flowers[J]. Hortic J, 84(3): 253-260.

THEIßEN G, MELZER R, RÜMPLER F, 2016. MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution[J]. Development, 143(18): 3259-3271.

TONG CG, WU FH, YUAN YH, et al., 2020. High-efficiency CRISPR/Cas-based editing of Phalaenopsis orchid *MADS* genes[J]. Plant Biotechnol J, 18(4): 889-891.

VIAENE T, VEKEMANS D, IRISH VF, et al., 2009. Pistillata—duplications as a mode for floral diversification in (Basal) asterids[J]. Mol Biol Evol, 26(11): 2627-2645.

WANG Y, MU YX, WANG J, 2021. Advances in the regulation of plant floral organ development by the *MADS-box* gene family[J]. Acta Agric Zhejiang, 33(6): 10.[王莹，穆艳霞，王锦，2021. *MADS-box* 基因家族调控植物花器官发育研究进展[J]. 浙江农业学报，33(6)：1149-1158.]

WATANABE K, ODA-YAMAMIZO C, SAGE-ONO K, et al., 2018. Alteration of flower colour in Ipomoea nil through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4[J]. Transgenic Res, 27(1): 25-38.

WU XB, HULSE-KEMP AM, WADL PA, et al. Genomic resource development for hydrangea (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.)—A transcriptome assembly and a high-density genetic linkage map[J]. Horticulturae, 2021, 7(25): 1-13.

XU JP, KANG BC, NAING AH, et al., 2020. CRISPR/Cas9-mediated editing of 1-aminocyclopropane -1- carboxylate oxidase1 enhances *Petunia* flower longevity[J]. Plant Biotechnol J, 18(1): 287-297.

YAN R, WANG ZP, REN YM, et al., 2019. Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* DC. Fisch. and *Lilium longiflorum* White Heaven[J]. Int J Mol Sci, 20(12): 2920

YANG YZ, FANNING L, JACK T, 2003. The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA[J]. Plant J, 33(1): 47-59.

YANG YZ, JACK T, 2004. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins[J]. Plantl Biol, 55(1): 45-59.

YU J, TU LH, SUBBURAJ S, et al., 2021. Simultaneous targeting of duplicated genes in *Petunia* protoplasts for flower color modification via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins[J]. Plant Cell Rep, 40(6): 1037-1045.

ZHANG B, YANG X, YANG CP, et al., 2016. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in *Petunia*[J]. Sci Rep, 6(1): 1-8.
ZHANG JJ, YANG ED, HE Q, et al., 2019. Genome-wide analysis of the *WRKY* gene family in drumstick (*Moringa oleifera* Lam.)[J]. PeerJ, 7(7093): 1-20.
ZHANG R, GUO CC, ZHANG WE, et al., 2013. Disruption of the petal identity gene *APETALA3-3* is highly correlated with loss of petals within the buttercup family (Ranunculaceae)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 110(13): 5074-5079.
ZHENG XW, OUYANG YW, PAN XL, et al., 2022. Analysis on cloning of *AcMADS14* gene and its expression during flower development of pine apple[J]. Guangdong Agric Sci, 49(1): 42-50. [郑雪文，欧阳嫣惟，潘晓璐等，2022. 菠萝 *AcMADS14* 基因的克隆及其在花发育中的表达分析[J]. 广东农业科学，49(1)：42-50.]
ZHU LF, 2013. Cloning and preliminary function analysis of B class genes in *Bambusa oldhamii* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University. [朱龙飞，2013. 绿竹 B 类基因克隆与功能初步分析[D]. 杭州：浙江农林大学.]